

100 ml/ aufgefüllt. Die Ansätze wurden 30 Min. bei Raumtemperatur stehengelassen und dann 0,25 ml/ der so erhaltenen etwa 0,5 mM Lösungen wie vorstehend angegeben zu 10 ml/ 25  $\mu$ M Mercuribenzoatlösung gegeben und der *p*-Mercuribenzoat-Überschuß nach 30 Min. mit 0,5 mM Cysteinlösung zurücktitriert.

#### Alkalische Hydrolyse von Benzylpenicillin

Etwa 50  $\mu$ Mol Benzylpenicillin wurden genau eingewogen, in einem 100 ml-Meßkolben mit 16,5 ml/ 1N NaOH versetzt und bei Raumtemperatur einige Std. stehengelassen. (Bei einer Hydrolysedauer zwischen 1 und 24 Std. ergaben die nachfolgenden Bestimmungen mit *p*-Mercuribenzoat annähernd gleiche Werte.)

Dann wurde mit 33 ml/ 1N Essigsäure abgepuffert (es stellt sich ein pH-Wert von 4,6 ein) und auf 100 ml/ aufgefüllt. 0,25 ml/ der so erhaltenen etwa 0,5 mM Lösungen der Hydrolyseprodukte wurden wie oben angegeben mit *p*-Mercuribenzoat bestimmt.

Wir danken den Farbwerken Hoechst AG für die kostenlose Überlassung von Penicillinen und Penicillinase, den Farnefabriken Bayer AG für Penicillin, der Fa. Heyl & Co. für Penicillin und Penicillamin und der Fa. Schering für die Durchführung der C,H-Bestimmung.

Frau BARBARA WYNHOFF und Fräulein BRIGITTE CLEMENS † danken wir für ihre technische Assistenz.

#### Literatur

1. SIEGMUND, P. und F. KÖRBER, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 349, 317 (1968). — 2. BOYER, P. D., J. Amer. chem. Soc. 76, 4331 (1954). — 3. CHINARD, F. P. und L. HELLERMANN, Method biochem. Analysis 1, 1 (1954). — 4. BENESCH, R. und R. E. BENESCH, Methods biochem. Analysis 10, 43 (1962). — 5. The Chemistry of Penicillin, S. 960, Hrsg. H. T. Clarke, J. R. Johnson und Sir R. Robinson, Princeton University Press, Princeton, New Jersey (1949). — 6. SCHUBERT, M. P., J. biol. Chemistry 121, 539 (1937). — 7. WEITZEL, G., J. ENGELMANN und A.-M. FRETZDORFF, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 315, 236 (1959). — 8. RATNER, S. und H. T. CLARKE, Amer. chem. Soc. 59, 200 (1937).

9. BÖHME, H. und H. WOJAHN, Deutsches Arzneibuch, 6. Ausgabe, 3. Nachtrag, Kommentar S. 321—333. Wiss. Verlags-Gesellschaft mbH Stuttgart und Govi-Verlag GmbH Frankfurt/Main (1959). — 10. PERLIN, A. S. und C. BRICE, Canad. J. Chem. 34, 85 (1956). — 11. MERZ, K. W., H. KNIIPS und H. LEHMANN, Pharmazie 20, 764 (1965). — 12. ARMSTRONG, M. D. und V. DU VIGNEAUD, J. biol. Chemistry 168, 373 (1947). — 13. ARMSTRONG, M. D. und V. DU VIGNEAUD, J. biol. Chemistry 173, 749 (1948). — 14. POLLOCK, M. R., Penicillinase, in The Enzymes, 2. Aufl. Bd. 4 S. 269, Hrsg. P. D. Boyer, H. Lardy und K. Myrbäck, Academic Press New York und London (1960).

Priv.-Doz. Dr. P. Siegmund  
1 Berlin 33  
Arnimallee 22

## Lokalisation und Charakterisierung der Lipase- bzw. Tributyrinase-Aktivitäten im perirenen Fettgewebe vom Schwein

Von U. H. KLEMENS

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin. (Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Schütte)

(Eingegangen am 6. April 1968)

Herrn Prof. Dr. Dr. Ernst Schütte zum 60. Geburtstag gewidmet

Im perirenen Fettgewebe vom Schwein werden zwei Lipasen und eine Tributyrin spaltende Esterase nachgewiesen. Nach der Enzymcharakteristik handelt es sich um eine Lipoprotein-Lipase, die dem Klärfaktor des Blutes (1, 2) bzw. der pH-8,5-Gewebslipase (3) ähnelt, sowie um eine Lipase, die viele Gemeinsamkeiten mit der Adrenalin-empfindlichen Lipase (3, 4) hat. Die Lipoprotein-Lipase und Tributyrinase sind überwiegend im Überstand des Ultrazentrifugates (120000 g, 2 Std.) lokalisiert. Das dritte beschriebene Enzym erscheint im Sediment.

Wir bestimmten die Substratspezifität, die pH-Optima, die  $K_m$ -Werte, die Stöchiometrie der Lipolyseprodukte, untersuchten die Stabilität der Enzyme unter verschiedenen Bedingungen, die Beeinflussung der Enzymaktivitäten durch bestimmte Inhibitoren bzw. Aktivatoren, und versuchten, die Enzyme in der Zwischenphase von hydrophoben und hydrophilen Medien anzureichern.

Two lipases and a tributyrin-cleaving esterase were demonstrated in the perirenal fat tissue of the pig. One of the lipases had the properties of a lipoprotein lipase, similar to the clearing factor of blood (1, 2), or the pH 8.5 - tissue lipase (3), and the other lipase had many properties in common with the adrenaline-sensitive lipase (3, 4). The lipoprotein lipase and the tributyrinase are localised predominantly in the supernatant of the ultracentrifugate (120,000 g, 2 hr.). The third enzyme was found in the sediment.

The substrate specificity, pH-optima and  $K_m$ -values of the enzymes, and the stoichiometry of the lipolysis products were determined. The stability of the enzymes under different conditions and the effect of inhibitors and activators on enzyme activity were studied; and it was attempted to concentrate the enzyme in the intermediate phase of hydrophobic and hydrophilic media.

In verschiedenen Geweben, z. B. im epididymalen Fettgewebe (3, 4, 5), im Herzmuskel der Ratte (2, 4, 6), und in der menschlichen Lunge (7) wurden Lipasen nachgewiesen und charakterisiert. Dabei konnten zwei Gewebslipasen differenziert werden:

1. Eine Lipoprotein-Lipase (2) bzw. pH-8,5-Lipase (3), die wahrscheinlich identisch sind. Beide haben viele Gemeinsamkeiten mit dem Klärfaktor des Blutplasmas

(1). Die Lipaseaktivitäten können durch Heparin beeinflusst werden. Man findet einen Anstieg der Lipaseaktivität im Puffermedium einer Fettgewebsinkubation, wenn zum Inkubationsgemisch Heparin hinzugegeben wird (3).

2. Eine Adrenalin-empfindliche Lipase (3, 4) die — im Gegensatz zur Lipoprotein-Lipase — im Fettgewebe von mageren Tieren eine größere Aktivität als bei

fetten Tieren hat (3, 4, 8, 9). Wenn Fettgewebe vor dem Homogenisieren in einer Adrenalin- oder ACTH-Lösung inkubiert wurde, so erscheint im Homogenat mehr lipolytische Aktivität (10).

Wir stellten uns die Aufgabe, die Lipasen bzw. die Tributyrinase des perirenal Fettgewebes vom Schwein zu klassifizieren. Im Zusammenhang mit der Heparin-induzierten Abgabe der Lipoproteid-Lipase aus dem Gewebe in das Inkubationsmedium interessierte die Lokalisation der gefundenen Lipasen in der Zelle. Wir untersuchten deshalb ihre quantitative Verteilung auf verschiedene, durch Zentrifugieren gewonnene Zellfraktionen.

## Methodik

### Aufarbeitung des Fettgewebes

Unmittelbar nach dem Schlachten der Tiere wurde das Fettgewebe entnommen und sofort in flüssigen Stickstoff eingebracht. Das gefrorene Gewebe wurde gemörstert. Das Fettgewebepulver ist bei  $-30^{\circ}$  mehrere Wochen haltbar. Wegen der Instabilität der Lipasen gegenüber Wärme wurde bei der weiteren Aufarbeitung auf eine konstante Temperatur von  $2-4^{\circ}$  geachtet. 5 g Fettgewebepulver wurden je nach Fragestellung in 20 ml 0,05M Veronalpuffer (pH 8,0), in 0,25M Saccharoselösung (pH 8,0), in 0,05M Phosphatpuffer (verschiedener pH-Werte), oder in bidest. Wasser suspendiert und mit dem Ultraturax homogenisiert. Beim anschließenden Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge (12100 g, 15 Min.) bildeten sich 3 Schichten, ein Sediment, ein Fettüberstand und eine wäßrige Zwischenschicht. Die Zwischenschicht wurde, wenn bei den einzelnen Versuchen nicht anders angegeben, in der Ultrazentrifuge (Spinco L 50) bei 120000 g 2 Stdn. zentrifugiert. Das Sediment wurde in einer der oben genannten Pufferlösungen bzw. Wasser suspendiert (Enzymlösung). Im Abschnitt 1 der Ergebnisse sind die Lipaseaktivitäten aller 5 aufgeführten Fraktionen bilanzmäßig erfaßt. Bei der Charakterisierung der Lipasen wurden die Enzymaktivitäten der beiden Ultrazentrifugenfraktionen unter verschiedenen Bedingungen ermittelt.

### Inkubationsansatz

Die Enzymlösungen wurden so verdünnt, daß 1 ml aus den verschiedenen Substraten in der Minute etwa  $2-3 \mu\text{g}$  Glycerin freisetzte. Parallel wurde ein Leerwert (Inaktivierung der Enzyme im siedenden Wasserbad, 10 Min.) angesetzt. 2 Vol. Enzymlösung bzw. inaktivierte Enzymlösung wurden mit 1 Vol. Substrat unter Schütteln im Wasserbad bei  $37^{\circ}$  inkubiert. Der pH-Wert des Inkubationsgemisches wird bei den einzelnen Versuchen angegeben. Die Reaktion wurde nach 15 Min. durch Einbringen in ein siedendes Wasserbad (10 Min.) gestoppt. Die ausgefallenen Proteine wurden in der Kühlzentrifuge bei 49500 g (10 Min.) sedimentiert. Im Überstand wurden Glycerin und freie Fettsäuren quantitativ bestimmt.

Die Substrate wurden mit demselben Puffer wie die Enzymlösung angesetzt.

Verwendet wurden: a) 2proz. Tributyrinsuspension, b) 5proz. Trioleinsuspension, c) 5proz. Trioleinsuspension mit Albumin in einer Konzentration von 2,5%, d) 5proz. aktivierte Trioleinsuspension (1). (0,5 g reines Triolein wurde mit 9,5 ml Serum-0,05M Veronalpuffer (pH 8,0, Serum-Puffer-Verhältnis 1:1) bei  $37^{\circ}$  2 Stdn. intensiv durchmischt. Dabei sollen Lipoproteide entstehen (1).) Die einzelnen Suspensionen wurden jeden Tag frisch angesetzt.

### Bestimmung von Glycerin und freien Fettsäuren

a) Glycerin wurde enzymatisch-optisch mit der Biochemica Test Combination (kombinierte Anwendung von Glycerokinase, Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase) der Firma Boehringer u. Soehne Mannheim, bestimmt.

b) Ölsäure wurde titrimetrisch mit 0,02N NaOH nach der Extraktion in ein organisches Lösungsmittel bestimmt (11). Bei der enzymatischen Hydrolyse von proteinfreier Triolein- bzw. Tributyrin-Suspension verwendeten wir auch eine Methode, bei der die freiwerdenden Säureäquivalente durch automatische Titration mit 0,02N NaOH in einer pH-Stat-Anordnung (Radiometer Kopenhagen) bestimmt wurden. Voraussetzung ist, daß im Inkubationsgemisch kein Puffer vorhanden ist.

### Spezifische Aktivität

Sie wird definiert als die Menge Glycerin oder Fettsäure (in  $\mu\text{Mol}$ ), die von einem mg Protein der Enzymlösung bei  $37^{\circ}$  pro Minute freigesetzt wird. Wir bestimmten die Proteine nach Kjeldahl, mit der Biuret-Methode bzw. dem Folin-Reagens (12).

### Zwischenphasen-Anreicherung der Enzyme in Anlehnung an BASKYS (13)

Es wurde untersucht, ob sich die Enzyme in der Zwischenphase zwischen organischen und wäßrigen Lösungsmitteln anreichern lassen. Wir beschreiben die Methode für Diäthyläther als organisches Lösungsmittel.

1 Vol. des Ultrazentrifugates (120000 g, 2 Stdn.) wurde mit 1 Vol. peroxidfreiem, vorgekühltem Äther bei  $2^{\circ}$  vorsichtig 10 Min. lang geschüttelt. Beim Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge (5000 g, 10 Min.) bildete sich zwischen organischer und wäßriger Phase eine membranartige Zwischenschicht. Die organische und wäßrige Phase wurden sorgfältig abpipettiert. Der zurückgebliebene Äther wurde aus der Zwischenschicht durch Einleiten von Stickstoff entfernt. (Beim Verwenden anderer organischer Lösungsmittel entfällt das Einleiten des Stickstoffes.) Die Zwischenschicht wurde in 0,05M Veronalpuffer (pH 8,0) suspendiert. In dieser Suspension und in der wäßrigen Schicht wurden die Enzymaktivitäten bestimmt.

## Ergebnisse

### 1. Fraktionierung der Enzymaktivitäten

Die Gesamtaktivität des Fettgewebshomogenates (= 100%) verteilt sich nach dem Zentrifugieren (12100 g) wie folgt auf 3 Schichten: Im Fettüberstand erscheinen 4–6%, in der wäßrigen Zwischenschicht 85–90% und im Sediment 10–12% der Ausgangsaktivität. Die Verteilung der Enzymaktivitäten ist unabhängig davon, ob als Substrat eine Tributyrin-, Triolein- oder aktivierte Triolein-Suspension verwendet wurde.

Die wäßrige Zwischenschicht, die praktisch die gesamte Enzymaktivität enthält, wurde mit der Ultrazentrifuge weiter fraktioniert. Die Verteilung der Enzymaktivitäten auf Überstand und Sediment ist in der Tabelle 1 zusammengestellt. Man ersieht aus Tabelle 2,

Tab. 1

Prozentuale Verteilung der Enzymaktivitäten der wäßrigen Zwischenschicht (12100g) auf Überstand und Sediment bei verschiedenen langer Zentrifugation bzw. unterschiedlichen g-Zahlen. Die Verteilung war identisch, wenn die Zwischenschicht 0,25M Saccharose (pH 8,0) oder 0,05 M Veronalpuffer (pH 8,0) enthielt. Ausgangsaktivität: 100%, pH-Wert des Inkubationsgemisches: pH 8,0

Substrat	[g]	Zentrifugation [Stdn.]	Enzymaktivitäten [%]	
			Überstand	Sediment
aktiviertes Triolein	71000	1	71	27
	120000	1	70	32
	190000	1	62	40
	120000	6	64	39
	120000	2	68	34
Triolein	120000	6	40	59
	120000	2	46	54
Triolein + Albumin	120000	2	53	48
Tributyrin	120000	2	86	25

Tab. 2

Zusammenstellung der spezifischen Enzymaktivitäten in Überstand und Sediment des Ultrazentrifugates (120000g, 2 Std.). Die Aktivitäten sind in  $\mu\text{Mol}$  Glycerin angegeben, die von 1 g Protein der Enzymlösungen freigesetzt wurden. (Enzymlösungen in 0,05M Veronalpuffer, pH 8,0)

Substrat	Spezifische Aktivität [ $\mu\text{Mol}/\text{Min.} \cdot \text{g}, 37^\circ$ ]	
	Überstand	Sediment
Triolein	6,1	26,7
Triolein + Albumin	6,8	34,2
aktiviertes Triolein	20,3	36,6
Tributyrin	23,8	21,2

daß 1 g Protein im Überstand etwa die 3–4fache Menge Glycerin freisetzt, wenn als Substrat an Stelle von Triolein aktiviertes Triolein verwendet wurde. Die Zugabe von Albumin steigert dagegen die Triolein-Hydrolyse nur unwesentlich. Wenn aber die Hydrolysedauer von 15 auf 60 Min. verlängert wurde, stieg die Hydrolyserate des Trioleins durch den Zusatz von Albumin um etwa 50–60% an. Dieser Effekt kann durch Hemmung der Lipolyse durch ihre Endprodukte erklärt werden. Während nach 15 Min. die freigesetzte Fettsäuremenge noch nicht hemmt, liegt sie nach 60 Min. im Bereich der Hemmkonzentration (s. Abschnitt 3). Durch Bindung der Fettsäuren an Albumin (14) und damit ihre Entfernung aus dem Reaktionsgleichgewicht kann die gehemmte Lipolyse wieder aktiviert werden.

Im Gegensatz zu den Befunden im Überstand steigt die Lipaseaktivität des Sedimentes bereits bei einer Hydrolysedauer von 15 Min. um etwa 30–40% an, wenn — an Stelle von proteinfreiem Triolein — Albumin und Triolein eingesetzt wurden. Um denselben Betrag wird auch die Lipolyse gesteigert, wenn aktiviertes Triolein als Substrat verwendet wurde.

## 2. Substratspezifität

Die höhere Aktivität der Lipase des Überstandes gegenüber aktiviertem Triolein deutet darauf hin, daß es sich um eine Lipoprotein-Lipase handelt. Aktiviertes Triolein enthält Lipoproteide (1).

Die Aktivität der Sediment-Lipase ist jedoch gegenüber einer aktivierten Trioleinsuspension nicht wesentlich größer als gegen Triolein + Albumin. Die Sediment-Lipase ist also keine Lipoprotein-Lipase.

## 3. Lipolyseprodukte

Die Lipaseaktivität nimmt ab, wenn die Hydrolyse länger als 20 Min. dauert. (Abb. 1). Sie kann durch Zusatz von Ca-Acetat bzw. Albumin zum Inkubationsgemisch wieder aktiviert werden. Beide Substanzen binden Fettsäuren und können dadurch die Endprodukthemmung der Lipolyse aufheben.

Wir untersuchten in diesem Zusammenhang die Hemmung der Hydrolyse von aktiviertem Triolein durch steigende Ölsäurekonzentrationen im Inkubationsgemisch. Bei einer Konzentration von  $8,9 \mu\text{Mol}/\text{ml}$  wurde die Lipase-Aktivität um 40–50% gehemmt. Um die Verfälschung der Ergebnisse durch die Endpro-

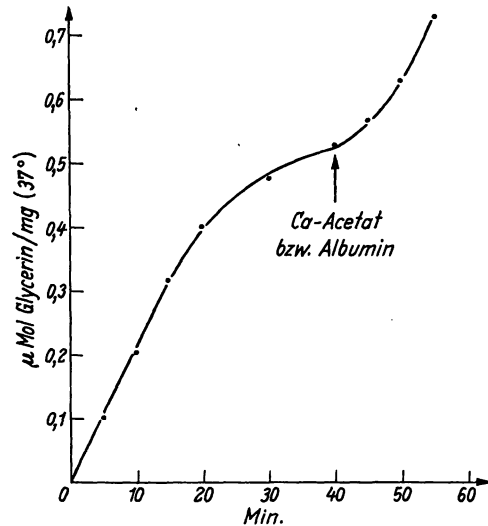


Abb. 1

Abhängigkeit der Lipaseaktivität von der Hydrolysedauer  
Ordinate: Freigesetzte Menge Glycerin ( $\mu\text{Mol}$ ) pro mg Protein der Enzymlösung. Abszisse: Hydrolysedauer (Min.). Enzymlösung: Überstand (in 0,05M Veronalpuffer). Substrat: aktiviertes Triolein. Nach 40 Min. Zugabe von Ca-Acetat bzw. Albumin zum Inkubationsansatz bis zu einer Konzentration von 0,03M bzw. 2,5%

dukthemmung auszuschließen, wählten wir eine kurze Hydrolysezeit von 15 Min., die mit der Enzymkonzentration in der Enzymlösung abgestimmt ist.

Weiter untersuchten wir das stöchiometrische Verhältnis der Lipolyse-Produkte. Die Lipoprotein-Lipase bzw. die Sediment-Lipase setzen aus einer proteinfreien bzw. aktivierten Triolein-Suspension pro Mol Glycerin etwa 9–10 Mol Fettsäuren frei. Dies bedeutet, daß nur etwa 30% der Ölsäure aus vollständig hydrolysiertem Triolein stammen kann. Der Rest resultiert aus der Teilhydrolyse zu Di- bzw. Mono-Oleat.

## 4. pH-Optimum

Der optimale Bereich der Lipaseaktivität des Sedimentes liegt, unabhängig von der Art des Substrates, zwischen pH 6,5–6,8. Im Überstand dagegen ist eine Abhängigkeit des pH-Optimums von der Art des Substrates zu erkennen (Abb. 2). Bei der enzymatischen Hydrolyse von aktiviertem Triolein ist die spezifische Aktivität bei pH 8,0–8,2 am größten. Verwendet man aber proteinfreies Triolein als Substrat, dann zeigt sich ein zweites pH-Optimum bei pH 6,5–6,8. Die Erklärung dafür ist, daß im Überstand des Ultrazentrifugates neben der Lipoprotein-Lipase auch noch eine geringe Menge Sediment-Lipase vorkommt. Deshalb kommt es zur Ausbildung eines zweiten pH-Optimums (Substrat: Triolein) in einem pH-Bereich, der sich mit dem pH-Optimum der Sediment-Lipase deckt. Dieses zweite pH-Optimum tritt bei der Hydrolyse von aktiviertem Triolein deshalb nicht hervor, weil es durch die große Aktivität der Lipoprotein-Lipase gegenüber diesem Substrat nivelliert wird. Es ist dagegen deutlich ausgeprägt, wenn in Abweichung zu den Standard-Bedingungen nur 1 Stunde bzw. bei 71000 g zentrifugiert wurde.

Die Frage der Substratspezifität der Lipoprotein-Lipase (Abschnitt 2) kann demnach dahingehend

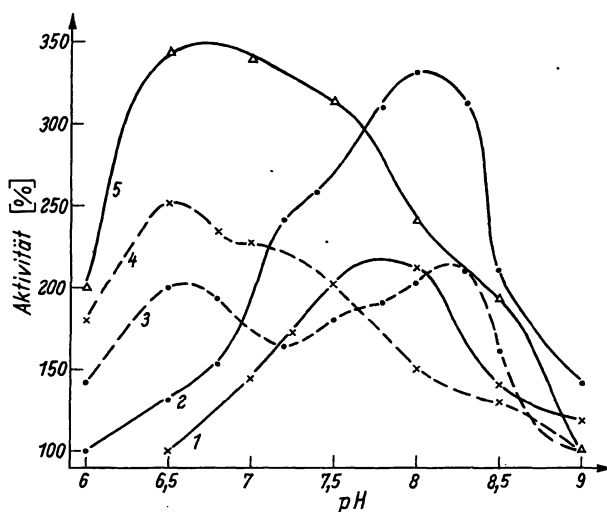


Abb. 2

pH-Optima der Enzymaktivitäten der Ultrazentrifugenfractionen. Als Enzymlösungen (in 0,05M Phosphatpuffer) bzw. als Substrate wurden eingesetzt: Versuchsreihe (1) Überstand, Tributyrin

(2) Überstand, aktiviertes Triolein,

(3) Überstand, Triolein,

(4) Sediment, aktiviertes Triolein,

(5) Sediment, Triolein.

Ordinate: Spezifische Aktivität in % der kleinsten Aktivität derselben Versuchsreihe. Abszisse: pH-Werte der Inkubationsansätze. Die Inkubationsbedingungen wurden in der Methodik beschrieben

ergänzt werden, daß das Enzym neben aktiviertem Triolein (optimales Substrat) mit geringerer Aktivität auch proteinfreies Triolein hydrolysieren kann.

### 5. Stabilität der Enzyme

#### a) bei Lagerung:

Fettgewebspulver, sowie Überstand und Sediment (nach Gefriertrocknung), können ohne Aktivitätsverlust bei  $-30^{\circ}$  mehrere Wochen gelagert werden. Dagegen sind die Lipasen in wäßrigen Medien instabil. Die Aktivitäten der Lipoprotein-Lipase bzw. der Sediment-Lipase nehmen nach 24 Std. bei  $4^{\circ}$  um etwa 40% bzw. 30% ab. Die Lipasen können gegen dest. Wasser etwa 6–8 Std. bei  $4^{\circ}$  ohne wesentlichen Aktivitätsverlust dialysiert werden.

#### b) gegenüber Hitze:

Aus der Tabelle 3 ergibt sich die Wärmeempfindlichkeit der einzelnen Enzyme: Lipoprotein-Lipase > Sediment-

Tab. 3

Wärmeempfindlichkeit der Enzyme. Angegeben sind die spezifischen Aktivitäten in % der Ausgangsaktivitäten (ohne Erwärmen). Die Enzyme wurden vor der Aktivitätsbestimmung (pH 8,0) in Wasserbädern mit verschiedenen Temperaturen 10 Min. inkubiert

	40°	45°	48°	50°	60°	70°
Lipoprotein-Lipase	88	52	30	12	4	0
Sediment-Lipase	95	75	50	35	5	0
Tributyrinase	100	100	95	90	18	5

Lipase > Tributyrinase. Die Inaktivierung der Lipasen durch Wärme (50°, 10 Min.) kann durch Cystein in einer Konzentration von 0,5 mM weder verhindert noch aufgehoben werden.

### 6. Michaelis-Menten-Konstanten

In beiden Ultrazentrifugenfractionen wurde die Beziehung zwischen Enzymaktivität und Substratkonzentration untersucht (Inkubationsmedium: 0,05M Veronalpuffer, pH 8,0).

Wir ermittelten folgende  $K_m$ -Werte:

a) Lipoprotein-Lipase (Substrat: aktiviertes Triolein): 4,5 mM

b) Sediment-Lipase (Substrat: Triolein): 1,9 mM

c) Tributyrinase (Substrat: Tributyrin): 2,7 mM.

### 7. Inhibitoren

In der Tabelle 4 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Charakteristisch für die Lipoprotein-Lipase ist die

Tab. 4

Zusammenstellung der Hemmsubstanzen. Dargestellt sind die spezifischen Aktivitäten der Enzyme in % der Ausgangsaktivität (ohne Inhibitor). Die Enzymaktivitäten wurden bei pH 8,0 bestimmt. Substrat: Tributyrin bzw. aktiviertes Triolein

Inhibitor	Konzentration	Lipoprotein-Lipase	Sediment-Lipase	Tributyrinase
Protamin	0,33 mg/ml	45	80	100
	0,66 mg/ml	30	55	97
NaCl	1,00M	20	70	92
NaF	0,22M	60	40	20
	0,44M	55	35	15
Pyrophosphat	0,0125M	18	40	55
Phosphat	0,0125M	100	100	100
	0,600M	75	85	100
pCMB <sup>1)</sup>	0,25 mM	15	50	100
pCMB <sup>1)</sup> + Cystein	0,25 mM } 0,25 mM }	95	105	105
peroxidhaltiger Äther		30	60	80
EDTA	0,004M	84	91	75

<sup>1)</sup> pCMB = p-Chlormercuribenzoat

starke Hemmung durch Protamin, NaCl und Pyrophosphat. Die Hemmung durch Protamin kann durch Zusatz von äquivalenten Mengen Heparin zum Inkubationsgemisch rückgängig gemacht werden. Auffallend ist die stärkere Hemmung der Lipoprotein-Lipase im Vergleich zur Sediment-Lipase durch p-Chlormercuribenzoat und peroxidhaltigen Äther. NaF hemmt dagegen die Sediment-Lipase stärker und besonders stark die Tributyrinase. Alle 3 Enzyme werden in gleicher Weise durch proteolytische Fermente inaktiviert.

### 8. Aktivatoren

Die Steigerung der Lipase-Aktivität durch Ca-Acetat bzw. Albumin wurde in den Abschnitten 2 und 3 beschrieben. Die Hydrolyse des Tributyrin wird durch Ca-Acetat nicht beeinflusst. Heparin aktiviert die Lipoprotein-Lipase nicht (1–50 E/ml).

Cystein (0,2 mM) vermag die Enzymaktivitäten nicht zu steigern, wenn die Enzymlösungen frisch hergestellt waren. Dagegen nahm die Aktivität beider Enzyme um etwa 30–40% zu, wenn die Enzymlösungen 5 bis 6 Tage lang eingefroren waren. Cystein kann also die „gealterten“ Lipasen reaktivieren.

### 9. Zwischenphasenanreicherung in Anlehnung an BASKYS (13)

Es wurde versucht, die Enzyme des Überstandes (120 000 g, 2 Std.) zwischen organischer und wäßriger Phase anzureichern. Als organische Lösungsmittel verwendeten wir Diäthyläther, Hexan, Butanol, Amylalkohol. Die Enzymlösung (in 0,05 M Veronalpuffer, pH 8,0) bildete die wäßrige Phase. Es zeigte sich, daß nur Äther als organische Phase verwendet werden kann (peroxidfrei). Etwa 70–80% der Lipoproteid-Lipase-Aktivität der Enzymlösung wird in der Zwischenphase gefunden. Dabei nimmt die spezifische Aktivität um das 5–6fache zu. Die Tributyrinase bleibt in der wäßrigen Phase, sie reichert sich in der Zwischenphase nicht an. Bei der Verwendung von Butanol kommt es in der Enzymlösung zum Ausfall von Eiweiß mit einer völligen Zerstörung der Enzymaktivitäten. Bei Amylalkohol fällt ebenfalls Eiweiß aus, die Enzyme werden jedoch nicht vollständig inaktiviert. Bei Hexan bildet sich keine Zwischenschicht aus. Die Enzyme der wäßrigen Phase werden durch Hexan nicht inaktiviert.

### Diskussion

Die prozentuale Verteilung der lipolytischen Aktivität auf die beiden Ultrazentrifugenfraktionen hängt (bei konstanten Zentrifugationsbedingungen) von den Bedingungen, unter welchen die Enzymaktivitäten bestimmt wurden, ab. Bei Bestimmung mit demselben Substrat, aber bei unterschiedlichen pH-Werten ergaben sich verschiedene Verteilungen. Bei pH 8,0, optimalen Bedingungen der Lipoproteid-Lipase (Substrat: aktiviertes Triolein) findet man 60% der Aktivität im Überstand, bei pH 6,5 dagegen nur 20%. Bei optimalen Bedingungen der Sediment-Lipase (Substrat: Triolein + Albumin, pH 6,5) wird im Sediment 75% der Lipaseaktivität, bei pH 8,0 aber nur 60% gefunden. Die Divergenz der Ergebnisse wird umso größer sein, je besser die Lipoproteid-Lipase bzw. die Sediment-

Lipase voneinander getrennt sind, ihr sind allerdings in dem Unterschied der pH-Optima bzw. der Differenz der spezifischen Enzymaktivitäten bei den einzelnen Substraten die Asymptoten vorgegeben.

Die Lipase des Überstandes, die wir wegen ihrer Substratspezifität als Lipoproteid-Lipase bezeichnen, scheint mit der von GORDON (15) bzw. BJÖRNTORP (3) beschriebenen pH-8,5-Lipase identisch zu sein. Es besteht auch große Ähnlichkeit mit der von KORN (2) beschriebenen Lipoproteid-Lipase, wenn man die Substratspezifität, das pH-Optimum und die Inhibitorwirkungen vergleicht. Die Lipoproteid-Lipase kann von der ebenfalls im Überstand lokalisierten Tributyrinase getrennt werden. Die Tributyrinase bleibt bei der Zwischenphasenverteilung in der wäßrigen Phase, während 70% der Lipoproteid-Lipase-Aktivität in der Zwischenphase gefunden wird.

Die Sediment-Lipase zeigt charakteristische Merkmale der von RIZACK (4) bzw. BJÖRNTORP (3) beschriebenen Adrenalinempfindlichen Lipase. Sie wird durch NaF gehemmt und kann durch Adrenalin aktiviert werden, wenn das Sediment 5–6 Tage eingefroren war (5 µg Adrenalin/ml).

Beide Lipasen werden durch SH-Reagenzien gehemmt. Die Integrität der SH-Gruppen scheint für die Enzymaktivität wichtig zu sein. Die Hemmung durch *p*-Chlormercuribenzoat kann durch äquivalente Mengen Cystein verhindert bzw. aufgehoben werden. Da der Aktivitätsverlust der 5–6 Tage lang eingefrorenen Enzyme ebenfalls durch Cystein aufgehoben wird, liegt die Annahme nahe, daß dem „Alterungsprozeß“ der Enzyme Veränderungen an den SH-Gruppen zugrunde liegen. Die Inaktivierung der Enzyme durch Erwärmen (50°, 10 Min.) scheint anderer Natur zu sein. Sie kann durch Cystein nicht aufgehoben werden.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Sachbeihilfen und Fr. CHRISTA DOROW für ihre fleißige, gewissenhafte Mitarbeit.

### Literatur

1. KORN, E. D., *Methods biochem. Analysis* 7, 145 (1959). —
2. KORN, E. D., *J. biol. Chemistry* 215, 1 (1955). —
3. BJÖRNTORP, P., *Amer. J. Physiol.* 203, 316 (1962). —
4. RIZACK, M., *J. biol. Chemistry* 236, 657 (1961). —
5. KORN, E. D. und T. W. QUIGLEY, *Biochim. biophysica Acta Amsterdam* 18, 143 (1955). —
6. KORN, E. D., *Science Washington* 120, 399 (1954). —
7. PILZ, W. und I. JOHANN, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 348, 73 (1967). —
8. HOLLENBERG, C. H., *Amer. J. Physiol.* 197, 667 (1959). —
9. PORKAJAC, N. und W. J. LOSOW, *Biochim. biophysica Acta Amsterdam* 139, 123 (1967). —
10. VAUGHAN, M. und S. E. BERGER, *J. biol. Chemistry* 239, 401 (1964). —
11. DOLE, V. P., *J. Clin. Invest.* 35, 150 (1956). —
12. LOWRY, O. H. und N. J. ROSENBOUGH, *J. biol. Chemistry* 193, 265 (1951). —
13. BASKYS, B., E. KLEIN und W. F. LEVER, *Federation Proc.* 20, 237 (1961).
14. GORDON, R. S., E. BOYLE und R. K. BROWN, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 84, 168 (1953). —
15. GORDON, R. S. und A. CHERKES, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 97, 150 (1958).

Dr. U. H. Klemens  
1 Berlin 19  
Spandauer Damm 130